

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用)



0	受理官庁記入欄 国際出願番号	
0-1	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	様式 PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書 は、 右記によって作成された。	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.163)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約 に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	A41803A
I	発明の名称	悪性黒色腫(メラノーマ)の診断剤
II	出願人 この欄に記載した者は	出願人である (applicant only)
II-1	右の指定国についての出願人である。	米国を除く全ての指定国 (all designated States except US)
II-4ja	名称	財団法人くまもとテクノ産業財団
II-4en	Name:	KUMAMOTO TECHNOLOGY & INDUSTRY FOUNDATION
II-5ja	あて名	8612202 日本国
II-5en	Address:	熊本県上益城郡益城町大字田原2081番地10 2081-10, Oaza Tabaru, Mashiki-machi, Kamimashiki-gun, Kumamoto 8612202 Japan
II-6	国籍(国名)	日本国 JP
II-7	住所(国名)	日本国 JP

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用)

III-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-1-1		
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	
III-1-4ja	氏名(姓名)	西村 泰治
III-1-4en	Name (LAST, First):	NISHIMURA, Yasuharu
III-1-5ja	あて名	8620937 日本国
III-1-5en	Address:	熊本県熊本市長嶺西 2 丁目 9-52 9-52, Nagaminenishi 2-chome, Kumamoto-shi, Kumamoto 8620937 Japan
III-1-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-1-7	住所(国名)	日本国 JP
III-2	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-2-1		
III-2-2	右の指定国についての出願人である。	
III-2-4ja	氏名(姓名)	中面 哲也
III-2-4en	Name (LAST, First):	NAKATSURA, Tetsuya
III-2-5ja	あて名	8611115 日本国
III-2-5en	Address:	熊本県菊池郡合志町豊岡 2527-464 2527-464, Toyooka, Goshimachi, Kikuchi-gun, Kumamoto 8611115 Japan
III-2-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-2-7	住所(国名)	日本国 JP
IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右 記のごとく出願人のために行動する。 名称	代理人 (agent) 特許業務法人特許事務所サイクス
IV-1-1ja		
IV-1-1en	Name:	SIKs & Co.
IV-1-2ja	あて名	1040031 日本国
IV-1-2en	Address:	東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 8th Floor, Kyobashi-Nisshoku Bldg., 8-7, Kyobashi 1-chome, Chuo-ku, Tokyo 1040031 Japan
IV-1-3	電話番号	03-3538-5680
IV-1-4	ファクシミリ番号	03-3538-5686

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用)

V	国の指定		
V-1	この願書を用いてされた国際出願は、規則4.9(a)に基づき、国際出願の時点で拘束される全てのPCT締約国を指定し、取得しうるあらゆる種類の保護を求める、及び該当する場合には広域と国内特許の両方を求める国際出願となる。		
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張 出願日	2003年 10月 29日 (29. 10. 2003)	
VI-1-1	出願番号	2003-368725	
VI-1-2	国名	日本国 JP	
VI-2	優先権証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の番号のものについては、出願書類の認証原本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁に対して請求している。	VI-1	
VII-1	特定された国際調査機関(ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	申立て	申立て数	
VIII-1	発明者の特定に関する申立て	—	
VIII-2	出願し及び特許を与えられる国際出願日における出願人の資格に関する申立て	—	
VIII-3	先の出願の優先権を主張する国際出願日における出願人の資格に関する申立て	—	
VIII-4	発明者である旨の申立て(米国を指定国とする場合)	—	
VIII-5	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て	—	
IX	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
IX-1	願書(申立てを含む)	4	✓
IX-2	明細書 (配列表または配列表に関連するテーブルを除く)	18	—
IX-3	請求の範囲	1	—
IX-4	要約	1	✓
IX-5	図面	4	—
IX-7a	国際出願に含まれる用紙の枚数(明細書の配列表を除く)	28	
IX-6a	明細書の配列表	2	—
IX-7	合計	30	

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用)

	添付書類	添付	添付された電子データ
IX-8	手数料計算用紙	✓	—
IX-16(A)	コンピュータ読み取り可能なヌクレオチド又はアミノ酸配列表	—	—
IX-16(A) -i)	規則13の3に基づき提出する国際調査のための写し(国際出願の一部を構成しない)	—	1 Diskette
IX-17	PCT-SAFE 電子出願	—	✓
IX-18	その他	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	—
IX-18	その他	国際事務局の口座への振込みを証明する書面	—
IX-18	その他	陳述書	—
IX-18	その他	磁気ディスクの記録形式等の情報を記載した書面	—
IX-19	要約書とともに提示する図の番号	—	—
IX-20	国際出願の使用言語名	日本語	—
X-1	出願人、代理人又は代表者の記名押印	特許業務法人特許事務所サイクス	
X-1-1	名称		
X-1-2	署名者の氏名		
X-1-3	権限		

## 受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	—
10-2	図面	—
10-2-1	受理された	—
10-2-2	不足図面がある	—
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であつてその後期間内に提出されたもの実際の受理の日(訂正日)	—
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	—
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	—

## 国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	—
------	-----------	---

## PCT手数料計算用紙(願書付属書)

原本(出願用)

[この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

0	受理官庁記入欄			
0-1	国際出願番号			
0-2	受理官庁の日付印			
0-4	様式 PCT/RO/101(付属書) このPCT手数料計算用紙は、 右記によって作成された。			
0-4-1		PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.163)		
0-9	出願人又は代理人の書類記号	A41803A		
2	出願人	財団法人くまもとテクノ産業財団		
12	所定の手数料の計算	金額/係数	小計 (JPY)	
12-1	送付手数料 T	⇒	13000	
12-2-1	調査手数料 S	⇒	97000	
12-2-2	国際調査機関 JP			
12-3	国際出願手数料 (最初の30枚まで) i1	123200		
12-4	30枚を越える用紙の枚数 0			
12-5	用紙1枚の手数料 (x) 0			
12-6	合計の手数料 i2	0		
12-7	i1 + i2 = i	123200		
12-12	EASYによる減額 R	-8800		
12-13	国際出願手数料の合計 (i-R) I	⇒	114400	
12-17	納付するべき手数料の合計 (T+S+I+P)	⇒	224400	
12-19	支払方法	送付手数料：特許印紙 調査手数料：特許印紙 国際出願手数料：銀行口座への振込み		

## 出願人による言及

13-1-1	出願人による言及	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
--------	----------	---------------------------

13-1-1	出願人による言及	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
--------	----------	---------------------------

13-2-3	チェック結果 氏名(名称)	Green? 出願人 1: 電話番号が記入されていません。
	チェック結果 氏名(名称)	Green? 出願人 1: ファクシミリ番号が記入されていません。
	チェック結果 氏名(名称)	Green? 代理人 1: 英文表記での名称はできるだけ大文字で記入してください。
13-2-4	チェック結果 優先権	Yellow この国際出願に対しては、国内優先権制度に関する国内法令が適用されます。日本の指定を取り下げるか、あるいは国内優先権主張を取り下げない限り、先の国内出願は、優先日から15ヶ月を経過したのち、取り下げられたものとみなされます。いずれの取下げであっても、先の出願が取り下げられる前に行われなければなりません。
13-2-7	チェック結果 内訳	Yellow! すべての出願人が願書に署名(記名押印)をしない限り、委任状又は包括委任状の写しを添付する必要性があります。
	チェック結果 内訳	Green? 要約書とともに提示する図の番号が示されていません。
13-2-10	チェック結果 注釈	Green? 願書に表示しなければならない通常の項目はすべて他のPCT-EASYの機能で入力することができます。言及を用いた表示の有効性について確認してください。

# 明細書

## 悪性黒色腫（メラノーマ）の診断剤

### 技術分野

本発明は、悪性黒色腫（メラノーマ）の診断剤及び診断キット、並びに悪性黒色腫（メラノーマ）の診断方法に関する。

### 背景技術

メラノーマは悪性黒色腫と呼ばれる皮膚がんの一種である。皮膚がんの種類は多様であるが、メラノーマは最も悪性度が高い皮膚がんである。皮膚を構成している細胞のなかにメラニン色素を産生する細胞があり、これを色素細胞（メラノサイト）と呼ぶが、この細胞ががん化したものがメラノーマである。

日本におけるメラノーマの発生数は人口 10 万人当たり 1.5 ~ 2 人程度であり、日本では年間 1500 人 ~ 2000 人程度発生していると推測されている。欧米では人口 10 万人あたり 10 数人以上の発生率と言われ、オーストラリアでは人口 10 万人あたり 20 数人以上の発生率で世界一発生数が高いと言われている。それだけに欧米やオーストラリアの人々はメラノーマに关心を持ち、メラノーマの発生に注意をしている。また、驚くことに、外国でも日本でもメラノーマの発生数は年々増加傾向が認められている。最近の調査では、日本におけるこの病気による年間死者数は 450 人前後もいる。メラノーマは何歳の人でも発生しているが、特に 40 歳以上になると発生が多くなり、60 歳 ~ 70 歳台が最も多くなっている。小児の発生は非常に少ないが、発生しないということではなく、最近 20 ~ 30 歳台の若年者の発生が多くなっている傾向がある。性別では特にどちらかに多いという傾向はなく、男女どちらにも発生する。日本人のメラノーマが発生しやすい部位は、足底（足のうら）が最も多く、約 3 割程度を占めている。足や指の爪の部分にも多くできることが、日本人の特徴である。そのほか、欧米人と同様に体、手、足、顔、頭など、どこの皮膚にも発生する。

一方、血清腫瘍マーカーの測定は、メラノーマの診断のみならず、術後症例における再発の早期発見と、進行期例の治療効果の判定に重要である。メラノーマの腫瘍マーカーとしては、これまでに血清のLDHや5-S-cysteinyl dopa (5-S-CD)の有用性が知られていたが、さらに近年、S-100 $\beta$ 蛋白およびmelanoma inhibitory activity (MIA)がより鋭敏なマーカーとして報告されている。日本においては、メラノーマの腫瘍マーカーとしては、5-S-CDが広く用いられている。しかし、いずれの腫瘍マーカーも、Stage IVといったかなり進行したものでないと陽性にならず、メラノーマの診断や、術後再発の早期発見という面では、有用性は限られているといわざるを得ない。

本発明者等は先に、23,040種の遺伝子を含むゲノムワイドのcDNAマイクロアレイの使用によって、20種の原発性肝細胞癌 (HCC) および胎生期を含む様々な正常臓器におけるこれらの遺伝子の発現プロファイルを検討し、グリピカン3 (glypican-3; GPC3) が、胎生期の肝臓、腎臓、肺に発現し、成人の正常臓器では胎盤以外ほとんど発現しないのに対し、ほとんどのHCCで高発現することを見いだした。さらに、このグリピカン3 (glypican-3; GPC3) が、分泌蛋白であり、ELISA法を用いて40%のHCC患者の血清中にグリピカン3 (glypican-3; GPC3) を検出することができ、これが、HCCの新しい腫瘍マーカーとして有用であることを報告した (Nakatsura, T.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 306, 16-25 (2003))。

1996年、Piliaらは、グリピカンファミリーのメンバーの1種をコードするグリピカン3 (glypican-3; GPC3) が、Simpson-Golabi-Behmel症候群 (SGBS) 患者において変異していることを報告した (Pilia, G.ら, Nat. Genet. 12, 241-247 (1996))。SGBSは出生前後の過成長、及び女性キャリアにおける非常に軽い表現型から男性乳児の致死的症状までの幅広い臨床的発現によって特徴付けられるX連鎖障害である (Neri, G.ら, Am. J. Med. Genet. 79, 279-283 (1998))。SGBSの臨床的特徴としては、特徴的な顔貌 (distinct facial appearance)、口蓋裂、合指、多指、副乳、囊胞性及び異形成腎、先天性心欠陥等が挙げられる

(Behmel, A. ら, *Hum. Genet.* 67, 409–413 (1984) ; Garganta, C. L. 及び Bodurtha, J. N., *Am. J. Med. Genet.* 44, 129–135 (1992) ; Golabi, M. 及び Rosen, L., *Am. J. Med. Genet.* 17, 345–358 (1984) ; 及び Gurrieri, F. ら, *Am. J. Med. Genet.* 44, 136–137 (1992))。G P C 3 変異のほとんどは点突然変異またはエクソンを含む数塩基の欠失であると報告されている (Hughes-Benzie, R. M. ら, *Am. J. Med. Genet.* 66, 227–234 (1996) ; Lindsay, S. ら, *J. Med. Genet.* 34, 480–483 (1997) ; Veugelers, M. ら, *Hum. Mol. Genet.* 9, 1321–1328 (2000) ; 及び Xuan, J. Y. ら, *J. Med. Genet.* 36, 57–58 (1999))。また、患者の表現型と変異の位置に相関性がないことから、S G B S は機能的G P C 3 タンパク質の欠損と、ファミリー内及びファミリー間の表現型の際に関連する他の遺伝的要因によって引き起こされる可能性が挙げられており (Hughes-Benzie, R. M. ら, *Am. J. Med. Genet.* 66, 227–234 (1996))、G P C 3 欠損マウスの研究からも、この仮説に対する支持が得られている (Cano-Gauci, D. F. ら, *J. Cell Biol.* 146, 255–264 (1999))。これらのマウスはS G B S 患者に見られる、過成長、嚢胞性及び異形成腎を含む異常のいくつかを有している。

ノーザンブロット解析を用いた研究から、G P C 3 mRNA はH C C、胎盤、胎児肝臓、胎児肺、胎児腎臓で過剰発現していることが報告されている (Zhu, Z. W. ら, *Gut* 48, 558–564 (2001) ; Hsu, H. C. ら, *Cancer Res.* 57, 5179–5184 (1997) ; 及び Pellegrini, M. ら, *Dev Dyn.* 213, 431–439 (1998))。

また、G P C 3 は細胞増殖の阻害剤であり、ある種の腫瘍細胞においてアポトーシスを誘導し得るため (Cano-Gauci, D. F. ら, *J. Cell Biol.* 146, 255–264 (1999) ; 及び Duenas Gonzales, A. ら, *J. Cell Biol.* 141, 1407–1414 (1998))、G P C 3 発現が種々の起源の腫瘍においてダウンレギュレートされているという報告がある。Lin らは、G P C 3 は正常な卵巣で発現しているが、ある種の卵巣癌細胞系においては検出できることを示した (Lin, H. ら, *Cancer Res.* 59, 807–810 (1999))。G P C 3 発現が見られない全てのケースにおいて、G P C 3 プロモーターが過度にメチル化されており、コード領域における変異はなく、また

脱メチル化剤で処理することによってG P C 3発現は回復した。更に、G P C 3の異所性発現は数種の卵巣癌細胞系においてコロニー形成活性を阻害することが報告されている。G P C 3と癌を関連付ける他のデータとしては、正常なラット中皮細胞及び中皮腫細胞系に関するディファレンシャルm R N Aディスプレイ研究から得られたものがある (Murthy, S. S. ら, *Oncogene* 19, 410-416 (2000))。この研究において、G P C 3は腫瘍細胞系において絶えずダウンレギュレートされていることが見出された。更に、同様のダウンレギュレーションは原発性ラット中皮腫及びヒトの中皮腫由来の細胞系においても見られている。卵巣癌と同様に、G P C 3コード配列中に変異は見出されていないが、ほとんどの細胞系でG P C 3プロモーター領域に異常なメチル化が見られている。報告されているように (Duenas Gonzales, A. ら, *J. Cell Biol.* 141, 1407-1414 (1998))、中皮腫細胞系におけるG P C 3の異所性発現はコロニー形成活性を阻害することが示された。更に最近、Xiang らは、G P C 3がヒトの乳癌においても発現していないことを報告した (Xiang, Y. Y. ら, *Oncogene* 20, 7408-7412 (2001))。これらのデータから、G P C 3がこれらの癌における成長の負のレギュレーターとして作用し得ることが示唆される。すなわち、G P C 3の発現は成人のG P C 3陽性組織から生じる癌における腫瘍の進行の間に低減し、この低減が悪性の表現型の発生において何らかの役割を果たしているように思われる。

反対に、H C Cの場合、腫瘍は胎児においてのみG P C 3を発現する肝臓組織から生じ、G P C 3発現は悪性への形質転換において再び現れる傾向がある。G P C 3の再発現がこれらの腫瘍の進行において重要であるか否かは明らかでない。ここ数年間に、細胞表面ヘパラン硫酸プロテオグリカン (H S P G) が線維芽細胞増殖因子 (F G F) 及びWnt等のヘパリン結合性成長因子の最適活性に必要であることが明らかとなった (Yayon, A. ら, *Cell* 64, 841-848 (1991) ; 及び Schlessinger, J. ら, *Cell* 83, 357-360 (1995))。グリビカンはG P Iアンカー型細胞表面H S P Gのファミリーであり、腫瘍形成とG P C 3の発現レベルの関係におけるこの組織特異的な差異は、G P C 3が各組織において成長と生存因子

を異なって調節しているためではないかと推測される。G P C 3 は少なくともこれらの臓器において癌胎児性タンパク質として働いているように思われる。一般に、癌胎児性タンパク質は腫瘍の進行において重要な役割を持つとはされていないが、腫瘍マーカーまたは免疫治療の標的として使用されてきた (Coggin, J.H. Jr., CRC Critical Reviews in Oncology/Hematology 5, 37-55 (1992) ; 及び Matsuura, H. 及び Hakomori S.-I., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 6517-6521 (1985))。G P C 3 の癌胎児性挙動が臨床的用途に利用し得るか否か、このグリビカンの再発現がH C C の進行において重要であるか否かは、更に研究の余地がある。

#### 発明の開示

メラノーマの腫瘍マーカーとしては、血清のL D H や日本で広く用いられている 5-S-cysteinyl-dopa (5-S-CD) 、さらに近年、より鋭敏なマーカーとして報告されている S-100  $\beta$  蛋白および melanoma inhibitory activity (MIA) があるが、いずれの腫瘍マーカーも、Stage IV といったかなり進行したものでないと陽性にならず、メラノーマの早期診断や、術後再発の早期発見という面では、有用性は限られているといわざるを得ない。メラノーマの早期診断には他に有用な腫瘍マーカーが必要である。即ち、本発明は、悪性黒色腫 (メラノーマ) の新規かつ臨床的に有用な診断剤を提供することを解決すべき課題とした。

本発明者等は、先に、c D N A マイクロアレイに基づいてヒト肝細胞癌において特異的に過剰発現している新規な癌胎児性タンパク質としてグリビカン 3 (G P C 3) を同定し、H C C 患者血清中に可溶性G P C 3 タンパク質を検出し、G P C 3 はH C C の新たな腫瘍マーカーとなり得ることを明らかにした。本発明者等は今回、マウスマラノーマ細胞株B 1 6 にG P C 3 が発現することを初めて発見し、G P C 3 がメラノーマにおいてもH C C と同様に高発現しており、有用な腫瘍マーカーになりうるのではないかと考えた。そこで本発明者等は、確認のための実験を行った結果、G P C 3 がメラノーマにおいて今までになかった早期診

断のできる腫瘍マーカーであることを見いだした。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

すなわち、本発明は、以下の（1）～（6）を提供する。

- (1) GPC3に対する抗体、又はGPC3の発現を検出できるプローブ若しくはプライマーを含む、悪性黒色腫（メラノーマ）の診断剤。
- (2) GPC3に対する抗体、又はGPC3の発現を検出できるプローブ若しくはプライマーを含む、悪性黒色腫（メラノーマ）の診断のためのキット。
- (3) サンプル中のGPC3を検出又は測定することを含む、悪性黒色腫（メラノーマ）の診断方法。
- (4) サンプルとGPC3に対する抗体とを接触させることを含む、(3)に記載の診断方法。
- (5) サンプル中のGPC3を定量することを含む、(3)又は(4)に記載の診断方法。
- (6) 悪性黒色腫（メラノーマ）の腫瘍マーカーとしてGPCを使用する方法。

#### 図面の簡単な説明

図1は、GPC3 mRNAの発現を示す。

##### A：マウス細胞系におけるGPC3 mRNAの発現

レーン 1: EL4, 2: Colon26, 3: B16, 4: MH129F, 5: MH129P, 6: MH134

その結果、B16 メラノーマ細胞系においてGPC3 mRNAの強い発現が示されたが、EL4, Colon26, MH129F, MH129P, MH134 ではそのような発現は見られなかつた。

##### B：ヒトメラノーマ細胞株におけるGPC3 mRNAの発現

レーン 1: 164, 2: 888mel, 3: Ihara, 4: CRL1579, 5: 526mel, 6: G361, 7: MeWo, 8: SK-MEL-28, 9: SK-MEL-19, 10: Colo38, 11: HMV-I, 12: HEMn (melanocyte)

164, 888mel, Ihara, CRL1579, MeWo メラノーマ細胞系においてGPC3 mRNAの強い発現が示され、526mel, G361, SK-MEL-28 細胞系において中程度の発

現が示されたが、SK-MEL-19, Colo38, HMV-I ではそのような発現は見られなかつた（図 1 B）。尚、培養メラノサイトにも若干発現がみられた。

#### C：ヒトメラノーマ組織における GPC3 mRNA の発現

レーン 1: 正常皮膚, 2: Pt 1 メラノーマ原発巣, 3: Pt 2 メラノーマ原発巣, 4: Pt 2 メラノーマリンパ節転移巣, 5: Pt 3 メラノーマ原発巣, 6: Pt 4 メラノーマ原発巣, 7: 先天性色素性母斑症例 1, 8: 先天性色素性母斑症例 2

正常皮膚には GPC3 mRNA の発現は認めなかつたが、ほとんどのメラノーマ組織で GPC3 mRNA の発現を認めた。一方、先天性色素性母斑でも GPC3 mRNA の発現を認めた。

図 2 は、免疫組織化学分析によるメラノーマおよび色素性母斑における GPC3 タンパクの発現を示す。

A: (Pt 6) X100 GPC3 メラノーマ癌部非癌部境界部, B: (Pt 7) X200 GPC3 メラノーマ癌部, C: 色素性母斑症例 3 X100 GPC3

正常皮膚には GPC3 タンパクがほとんど発現しないのに対し、メラノーマ細胞および色素性母斑では、 GPC3 タンパクが高発現していた。

図 3A はメラノーマ細胞系の培養上清中に分泌される GPC3 タンパク質の ELISA による定量の結果を示す。HepG2 細胞  $1 \times 10^5$  個の 24 時間培養後の培養上清 1 ml 中の GPC3 タンパク質の濃度を 1 U/ml と規定した。HepG2 培養上清中の GPC3 タンパク質の量よりは少ないが、11 種類のメラノーマ細胞株のうち、5 種類の培養上清中に GPC3 タンパクが検出された。

図 3B はメラノーマ患者血清中の可溶性 GPC3 タンパク質の存在を示す。91 名の術前メラノーマ患者、5 名の巨大先天性色素性母斑患者、及び 60 名の健康なドナー (HD) の血清中の GPC3 タンパク質の量を ELISA によって評価した（図 3B）。60 名の HD、5 名の巨大先天性色素性母斑患者の血清中には GPC3 タンパク質は全く検出されなかつた。91 名のメラノーマ患者の 39.6% (36/91)、5 名の巨大先天性色素性母斑患者の 0% (0/5)、HD の 0% (0/60) が GPC3 タンパク質陽性であった。さらに、そのうち、術後の経過をおうこと

ができた14例すべてにおいて、摘出手術後には血清中にG P C 3 タンパクが検出されなくなった。

図4Aはメラノーマ患者血清中のStage別可溶性G P C 3 タンパク質の存在を示す。(+)は術前患者、(-)は術後で患者さんにメラノーマが存在しないと思われる症例。Nは症例数。

図4Bはメラノーマ患者血清中のStage別5-S-CDを示す。

図4Aと同じ症例の5-S-CD(nmol/L)を示す。カットオフ値を10(nmol/L)に設定した。

図4Cはメラノーマ患者血清中のStage別MIAを示す。

図4Aと同じ症例のMIA(ng/ml)を示す。カットオフ値を17(ng/ml)に設定した。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明者等は、(Nakatsura, T.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 306, 16-25 (2003))に記載の方法を用い、グリピカン3 (G P C 3) がメラノーマの早期診断に有用な血清腫瘍マーカーであることを見いだした。

ヒトG P C 3タンパク質のアミノ酸配列は公知であり、例えばGenBankのタンパク質データベースにAccession No. NP\_004475として登録されており、当業者であれば容易に入手することができる。

本発明は、G P C 3に対する抗体、又はG P C 3の発現を検出できるプローブ若しくはプライマーを含む、悪性黒色腫(メラノーマ)の診断剤を提供する。

G P C 3に対する抗体は、当業者に公知の方法(例えば、「新生化学実験講座1, タンパク質I, 389-406, 東京化学同人」参照)により調製することが可能である。G P C タンパク質はアミノ酸配列が前記のように公知であり、該アミノ酸配列に基づいて通常のタンパク質発現技術を用いて製造でき、また市販のもの(Santa Cruz, CA)を利用することも可能である。市販のG P C 3を用いる場合は、必要に応じてSDS-OutTM (Sodium Dodecyl Sulfate Precipitation Reagent; PIERCE, Rockford, ILより購入)を用いてSDSを除いて使用することが好ましい。また

G P C 3 の部分ペプチドは、G P C 3 のアミノ酸配列から適当な部分配列を選択し、通常のペプチド合成技術を用いて製造できる。

ポリクローナル抗体の調製は、例えば、ウサギ、モルモット、マウス、ニワトリなどの動物に適量のG P C 3 タンパク質またはその部分ペプチドを投与する。投与は、抗体産生を促進するアジュバント (FIA や FCA) と共にあってもよい。投与は、通常、数週間ごとに行う。免疫を複数回行うことにより、抗体価を上昇させることができる。最終免疫後、免疫動物から採血を行うことにより抗血清が得られる。この抗血清に対し、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテイン A や固定化抗原を用いたアフィニティー精製を行うことにより、ポリクローナル抗体を調製することができる。一方、モノクローナル抗体の調製は、例えば、G P C 3 タンパク質もしくはその部分ペプチドを、上記と同様に動物に免疫し、最終免疫後、この免疫動物から脾臓またはリンパ節を採取する。この脾臓またはリンパ節に含まれる抗体産生細胞とミエローマ細胞とをポリエチレングリコールなどを用いて融合し、ハイブリドーマを調製する。目的のハイブリドーマをスクリーニングし、これを培養し、その培養上清からモノクローナル抗体を調製することができる。モノクローナル抗体の精製は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテイン A や固定化抗原を用いたアフィニティー精製により行うことができる。尚、本発明の目的のためには、抗体はG P C 3 のいかなるエピトープを認識するものであっても良い。

本発明で使用する抗体は、上記の通り調製したイムノグロブリン分画を使用してもよいが、さらにG P C 3 タンパク質との結合部位のみを分離した  $F(ab')_2$ ,  $Fab'$ ,  $Fab$  などの分画を使用することもできる。

診断剤としての正確性のためには、抗体はヒト型抗体もしくはヒト抗体であることが好ましい。ヒト型抗体は、例えば、マウス-ヒトキメラ抗体であれば、G P C 3 タンパク質に対する抗体を産生するマウス細胞から抗体遺伝子を単離し、その H鎖定常部をヒト IgE H鎖定常部遺伝子に組換え、マウス骨髄腫細胞に導入す

ることにより調製できる。また、ヒト抗体は、免疫系をヒトと入れ換えたマウスにG P C 3 タンパク質を免疫することにより調製することが可能である。

本発明の診断剤における抗体の濃度は特に限定されないが、例えば0. 1から10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で用いることができる。診断剤には上記G P C 3に対する抗体の他に、必要に応じて薬学的に許容される担体等を適宜含有させることができる。

本発明は更に、サンプル中のG P C 3を検出又は測定することを含む、メラノーマの診断方法を提供する。例えば、サンプルとG P C 3に対する抗体を接触させることによって、サンプル中のG P C 3を検出又は測定することができる。本発明におけるサンプルとしては、メラノーマに罹患しているおそれのある被験者から得られる血清、唾液又は尿などの体液、あるいは皮膚組織切片等が挙げられるが、特に好ましくは血清である。サンプルと上記抗体との接触は、当分野において通常行われている方法に基づいて行えばよく、特に限定するものではない。

皮膚組織切片をサンプルとする場合は、常法に従って作製した臓器の組織切片をG P C 3に対する抗体を用いて、免疫染色を行い、G P C 3の発現の有無を見ることによって、悪性黒色腫（メラノーマ）が生じているかどうかを判定することができる。

また、血清などの体液をサンプルとする場合には、例えばサンプルと上記抗体との接触の後、サンプル中に存在し得るG P C 3と抗体との特異的結合を、蛍光物質や発光物質、酵素等で標識した二次抗体等を使用して定量的に検出することにより行うことができる。

即ち、本発明の方法によりサンプル中のG P C 3を検出又は測定するためには、サンプルとG P C 3に対する抗体とを反応させ、反応生成物である複合体を検出すればよい。酵素、放射性物質、蛍光物質などの標識をあらかじめ抗体に結合させておくことにより、反応生成物である複合体を検出することが可能になる。具体的には、G P C 3に対する抗体を用いて、例えばサンドイッチ法、競合法、凝集法、またウエスタンブロッティング法などの公知の測定法によりG P C 3を検出又は測定することによって悪性黒色腫（メラノーマ）の診断が可能である。

また、診断のための反応をウェル等の液相中で行ってもよく、あるいはG P C 3に対する抗体を固定した固相支持体上で行ってもよい。この場合、メラノーマに罹患していない正常なサンプル、あるいはメラノーマであることが判明しているサンプルを用いて予め作製した標準値と比較することによって、測定された値がメラノーマ陽性であるか否かを判定することができる。また、診断の際には、多数のメラノーマ患者と健常人の血清中G P C 3量を測定して、カットオフ値を設定することが好ましい。

本発明の診断方法は、メラノーマに罹患しているか否かの診断に用いることができる他、メラノーマに対する治療の効果を確認するために経時的に行うこともできる。

さらに本発明の悪性黒色腫（メラノーマ）の診断においてG P C 3を検出又は測定する場合、G P C 3を蛋白質として検出するだけではなく、G P C 3のm R N Aを検出する方法を用いてもよい。即ち、G P C 3のm R N AとハイブリダイズしうるD N AまたはR N Aを試料と反応させ、試料中のG P C 3のm R N Aと、D N AまたはR N Aとのハイブリダイゼーション生成物を検出すればよい。m R N Aを検出する方法としては、例えば*in situ*ハイブリダイゼーション法、ノーザンブロッティング法、R T-P C R法などが挙げられる。即ち、本発明によれば、G P C 3の発現を検出できるプローブ若しくはプライマーを含む、悪性黒色腫（メラノーマ）の診断剤が提供される。上記プローブ若しくはプライマーは、公知のヒトG P C 3タンパク質のアミノ酸配列（例えばGenBankのタンパク質データベースのAccession No. NP 004475）に基づいて当業者であれば適宜設計及び入手することができる。

本発明はさらに、G P C 3に対する抗体、又はG P C 3の発現を検出できるプローブ若しくはプライマーを含む、悪性黒色腫（メラノーマ）の診断のためのキットを提供する。本発明のキットとしては、G P C 3に対する抗体を用いる場合には、例えば、サンドイッチ法、競合法、凝集法、またウエスタンブロッティング法などの分析を行うのに必要な試薬を含むキットが挙げられる。また、G P C

3の発現を検出できるプローブ若しくはプライマーを用いる場合には、*in situ*ハイブリダイゼーション法、ノーザンブロッティング法、RT-PCR法などの分析を行うのに必要な試薬を含むキットが挙げられる。

本発明はさらに、悪性黒色腫（メラノーマ）の腫瘍マーカーとしてGPC3を使用する方法にも関する。該方法は、悪性黒色腫（メラノーマ）の腫瘍マーカーとしてGPC3を使用することによって悪性黒色腫（メラノーマ）を診断する方法の全てを包含するものであり、その態様が限定されない。悪性黒色腫（メラノーマ）の腫瘍マーカーとしてGPC3を使用する方法の具体例としては、GPC3に対する抗体を用いてサンプル中のGPC3を、例えば、サンドイッチ法、競合法、凝集法、またウエスタンブロッティング法などにより検出又は測定する方法、並びに、GPC3の発現を検出できるプローブ若しくはプライマーを用いることによって、サンプル中のGPC3の発現を*in situ*ハイブリダイゼーション法、ノーザンブロッティング法、RT-PCR法などにより検出又は測定する方法が包含される。

以下、実施例を挙げて本発明を更に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

### 実施例

#### [実施例1] マウス細胞株におけるGPC3 mRNAの発現

逆転写-PCR (RT-PCR) を用いたGPC3 mRNA発現を検討した。マウス細胞系であるMH129F, MH129P及びMH134は東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターから入手した。EL4, Colon26, B16は熊本大学のM. Ogawa博士よりご供与頂いた。

RT-PCRは公知の方法（例えばNakatsura, T.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 281, 936-944 (2001)）に従って行った。500bpの断片を增幅するマウスGPC3遺伝子特異的PCRプライマーを設計し、これを用いて94°C、5分の初期変性、及び58°Cのアニーリング温度での30增幅サイクルからなるRT-

PCR反応を行った。用いたGPC3 PCRプライマー配列は、センス：5'-ACGGGATGGTGAAAGTGAAGA-3'（配列番号1）、アンチセンス：5'-GAAAGAGAAAAGAGGGAAACA-3'（配列番号2）である。

マウス細胞系におけるGPC3 mRNAの発現を比較した。その結果、B16 メラノーマ細胞系においてGPC3 mRNAの強い発現が示されたが、EL4, Colon26, MH129F, MH129P, MH134ではそのような発現は見られなかった（図1A）。

#### [実施例2] ヒトメラノーマ細胞株におけるGPC3 mRNAの発現

逆転写-PCR（RT-PCR）を用いたGPC3 mRNA発現を検討した。メラノーマ細胞系であるG361, CRL1579, SK-MEL-28, HMV-I及びHMV-IIは東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターから入手した。526mel, 888melは慶應大学のY. Kawakami博士よりご供与頂いた。また、Ihara, MeWo, colo38は熊本大学のT. Kageshita博士よりご供与頂いた。さらに、培養ヒト表皮メラニン細胞HEMnは、クラボウ（倉敷紡績株式会社）より購入した。

RT-PCRは公知の方法（例えばNakatsura, T.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 281, 936-944 (2001)）に従って行った。939bpの断片を増幅するヒトGPC3遺伝子特異的PCRプライマーを設計し、これを用いて94°C、5分の初期変性、及び58°Cのアニーリング温度での30增幅サイクルからなるRT-PCR反応を行った。用いたGPC3 PCRプライマー配列は、センス：5'-GTTACTGCAATGTGGTCATGC-3'（配列番号3）、アンチセンス：5'-CTGGTGCCCCAGCACATGT-3'（配列番号4）であり、対照実験のためのβ-アクチンPCRプライマー配列は、センス：5'-CCTCGCCTTGCCGATCC-3'（配列番号5）、アンチセンス：5'-GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC-3'（配列番号6）である。

対照であるβ-アクチンmRNAによる標準化の後、メラノーマ細胞系におけるGPC3 mRNAの発現を比較した。その結果、164, 888mel, Ihara, CRL1579, MeWoメラノーマ細胞系においてGPC3 mRNAの強い発現が示され、526mel, G361, SK-MEL-28細胞系において中程度の発現が示されたが、SK-MEL-19, Colo38,

HMV-I ではそのような発現は見られなかった（図 1 B）。尚、培養メラノサイトにも若干発現がみられた。

#### [実施例 3] ヒトメラノーマ組織における GPC3 mRNA の発現

同様に、ヒト正常皮膚、ヒトメラノーマ、ヒト色素性母斑組織における GPC3 mRNA の発現を調べた。検体は、熊本大学医学部皮膚科学講座において治療されたインフォームドコンセントの得られたものを、T. Kageshita 博士より御供与頂いた。その結果、正常皮膚には GPC3 mRNA の発現は認めなかつたが、ほとんどのメラノーマ組織で GPC3 mRNA の発現を認めた。一方、先天性色素性母斑でも GPC3 mRNA の発現を認めた。

#### [実施例 4] メラノーマにおける GPC3 タンパク質の発現

21 名のメラノーマ患者から切除したメラノーマ組織周辺のメラノーマ及び非癌性領域および 11 名の色素性母斑患者から切除した色素性母斑組織周辺の色素性母斑及び正常皮膚領域における GPC3 の免疫組織化学分析を行った。

免疫組織化学分析は、当分野において公知の方法に従って行った (Nakatsura, T. ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 281, 936-944 (2001))。ホルマリン固定してパラフィン包埋した厚さ 4  $\mu$ m の組織サンプル切片を 1 : 200 に希釈した抗-GPC3 抗体と共に染色した。代表的な結果を図 2 に示す。

図 2 A, B に示すように、メラノーマ 2 例とも、正常皮膚には GPC3 タンパクがほとんど発現しないのに対し、メラノーマ細胞では、GPC3 タンパクが高発現していた。一方、図 2 C に示すように、色素性母斑でも GPC3 タンパクは高発現していた。メラノーマの 21 例中 17 例 (81.0%) および色素性母斑の 11 例中 10 例で GPC3 タンパクは高発現していた。

#### [実施例 5] メラノーマ細胞系の培養上清及びメラノーマ患者血清中の可溶性 GPC3 タンパク質の存在

G P C 3 303-464 のアミノ酸に対応する組換えタンパク質に対して作製された抗-G P C 3 ウサギポリクローナル抗体 (Santa Cruz, California) のビオチン化のために FluoReporter Mini-Biotin-XX Protein Labeling Kit (F-6347) (Molecular Probes, Inc., Eugene) を使用した。96 ウェルの E L I S A プレート (Nunc, Denmark) を 4 °C で一晩、P B S、p H 7.4 中 0.1 μg/ウェルの抗-ヒト G P C 3 303-464 (Santa Cruz) でコートした。次いで、100% ブロックエース (大日本製薬株式会社) を用い、室温で 1 時間、プレートをブロッキングした。陽性対照の標準サンプル及び培養上清、10% ブロックエースで 200 倍希釈した患者血清をビオチン化抗-G P C 3 抗体と共に添加し、室温で 2 時間インキュベーションした。P B S で 3 回洗浄した後、各ウェルに H R P-コンジュゲートストレプトアビジン (ENDOGEN, Woburn) を添加した。30 分のインキュベーションの後、プレートを P B S で 3 回洗浄し、T M B 基質溶液 (ENDOGEN) を添加した。解析のために E L I S A リーダー (モデル 550、Bio-Rad) を 405 nm で用いた。

インフォームドコンセントを得た後、熊本大学医学部皮膚科学講座において治療を受けたメラノーマ患者から血清サンプルを得た。G P C 3 は G P I-アンカーモデルタンパク質であり、分泌タンパク質である可能性が報告されている (Filimur J., Glycobiology 11, 19R-23R (2001))。本発明者らは先に、このグリピカン 3 (glypican-3; G P C 3) が、分泌蛋白であり、ELISA 法を用いて 40% の H C C 患者の血清中にグリピカン 3 (glypican-3; G P C 3) を検出することができ、これが、H C C の新しい腫瘍マーカーとして有用であることを報告した (Nakatsura, T. ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 306, 16-25 (2003))。そこで、今回、メラノーマにおいても G P C 3 タンパク質が分泌されるかどうかの検出を試みた。

抗-G P C 3 303-464 抗体及びビオチン化抗-G P C 3 抗体を用いて酵素結合免疫吸着検査法 (E L I S A) による検出を行った。G P C 3 303-464 に対応する市販の組換えタンパク質を用い、E L I S A 系における G P C 3 の定量の精度

を確認した。HepG2 培養上清の連続希釈を用い、ODデータに基づいてGPC3タンパク質を定量する標準曲線を評価した。 $1 \times 10^5$  個の HepG2 細胞を 24 時間培養した後の培養上清 1 ml 中の GPC3 タンパク質の濃度を 1 U/ml と規定した。HepG2 培養上清中の GPC3 タンパク質の量よりは少ないが、11 種類のメラノーマ細胞株のうち、5 種類の培養上清中に GPC3 タンパクが検出された。また、培養メラノサイトの培養上清中には GPC3 タンパクは検出されなかった（図 3A）。

次に、メラノーマ患者血清中の可溶性 GPC3 タンパク質の検出を行った（図 3B）。91 名の術前メラノーマ患者から血液サンプルを採取し、医療記録から患者のプロファイルを集めて TNM 分類に基づいて臨床段階を決定した。91 名のメラノーマ患者、5 名の巨大先天性色素性母斑患者、及び 60 名の健康なドナー（HD）の血清中の GPC3 タンパク質の量を ELISA によって評価した（図 3B）。60 名の HD および 5 名の巨大先天性色素性母斑患者の血清中には GPC3 タンパク質は全く検出されなかった。91 名のメラノーマ患者の 39.6% (36/91)、5 名の巨大先天性色素性母斑患者の 0% (0/5)、HD の 0% (0/60) が GPC3 タンパク質陽性であった。さらに、そのうち、術後の経過をおうことができた 14 例すべてにおいて、摘出手術後には血清中に GPC3 タンパクが検出されなくなった。表 1 は、メラノーマ患者血清中の可溶性 GPC3、5-S-CD、MIA を示す。

表 1

stage	GPC3	5-S-CD	MIA
0	<u>4/9 (44.4%)<sup>a</sup></u>	0/9 (0.0%)	1/9 (11.1%)
I	<u>10/25 (40.0%)</u>	2/25 (8.0%)	5/25 (20.0%)
II	<u>10/21 (47.6%)</u>	2/20 (10.0%)	1/21 (4.8%)
III	7/18 (38.9%)	5/18 (27.8%)	3/18 (16.7%)
IV	5/18 (27.8%)	<u>15/18 (83.3%)</u>	<u>9/18 (50.0%)</u>
総計	<u>36/91 (39.6%)</u>	24/90 (26.7%)	19/91 (20.9%)

a : 同一の臨床ステージ群の他より有意に高い値は下線で示す。

図 4 A, B, C, 並びに表 1 の結果から明らかなように、従来のメラノーマの腫瘍マーカー、5-S-CD(図 4 B)、最近注目されている MIA(図 4 C) はいずれも Stage III, IV の進行したメラノーマでしか有用でないが、GPC3 (図 4 A) は Stage 0, I, II の早期でもメラノーマの診断に有効で、メラノーマの新規な腫瘍マーカーとして有用であることが明らかとなった。なお、MIA の測定には、ドイツ Roche 社の MIA ELISA キットを用いた。

表 2 は、メラノーマ肉眼分類別のメラノーマ患者血清中可溶性 GPC3 を示す。

表 2

型	血清中のGPC3の陽性率
ALM (末端黒子型)	15/44 (34.1%)
SSM(表在拡大型)	9/16 (56.3%)
LMM/LM(悪性黒子型)	4/9 (44.4%)
NM(結節型)	2/5 (40.0%)
Mucous(粘膜型)	3/12 (25.0%)
総計	33/86 (38.4%)

表 2 の結果は、日本人に多い足の裏にできる末端黒子型よりもむしろ欧米人に

多くみられる表在拡大型や悪性黒子型の診断に若干強いことが示唆され、日本だけでなく、世界中のメラノーマの診断に十分寄与すると考えられた。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、G P C 3 がメラノーマを早期に診断できる腫瘍マーカーとして有用であることが実証された。本発明によりメラノーマの腫瘍マーカーとしてG P C 3 を使用することによって、メラノーマに罹患しているか否かを早期かつ簡便に診断することが可能になる。G P C 3 は、世界中の多くのメラノーマ患者に対する癌診断における用途に対して非常に有用である。

## 請求の範囲

1. GPC 3に対する抗体、又はGPC 3の発現を検出できるプローブ若しくはプライマーを含む、悪性黒色腫（メラノーマ）の診断剤。
2. GPC 3に対する抗体、又はGPC 3の発現を検出できるプローブ若しくはプライマーを含む、悪性黒色腫（メラノーマ）の診断のためのキット。
3. サンプル中のGPC 3を検出又は測定することを含む、悪性黒色腫（メラノーマ）の診断方法。
4. サンプルとGPC 3に対する抗体とを接触させることを含む、請求項3に記載の診断方法。
5. サンプル中のGPC 3を定量することを含む、請求項3又は4に記載の診断方法。
6. 悪性黒色腫（メラノーマ）の腫瘍マーカーとしてGPCを使用する方法。

## 要約書

本発明の目的は、悪性黒色腫（メラノーマ）の新規かつ臨床的に有用な診断剤を提供することである。本発明によれば、G P C 3に対する抗体、又はG P C 3の発現を検出できるプローブ若しくはプライマーを含む、悪性黒色腫（メラノーマ）の診断剤が提供される。

図 1

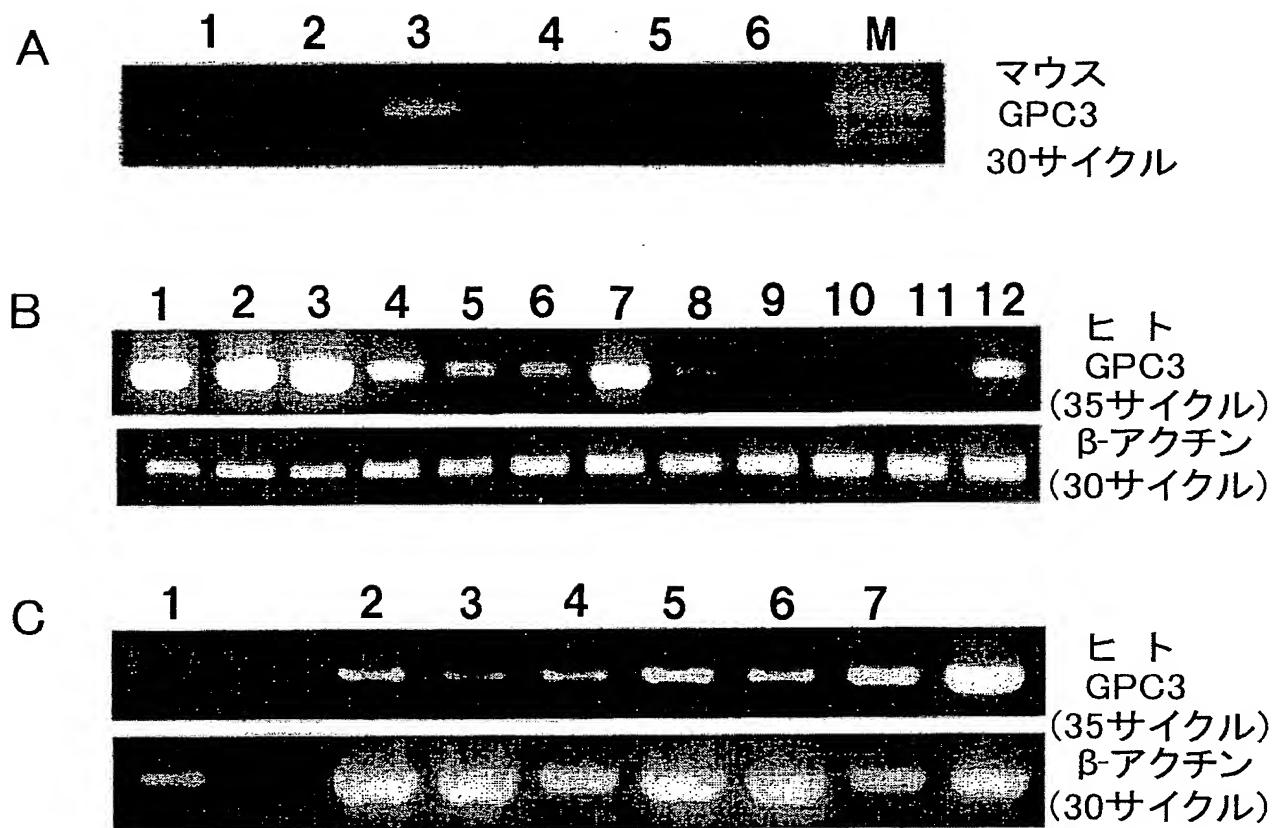
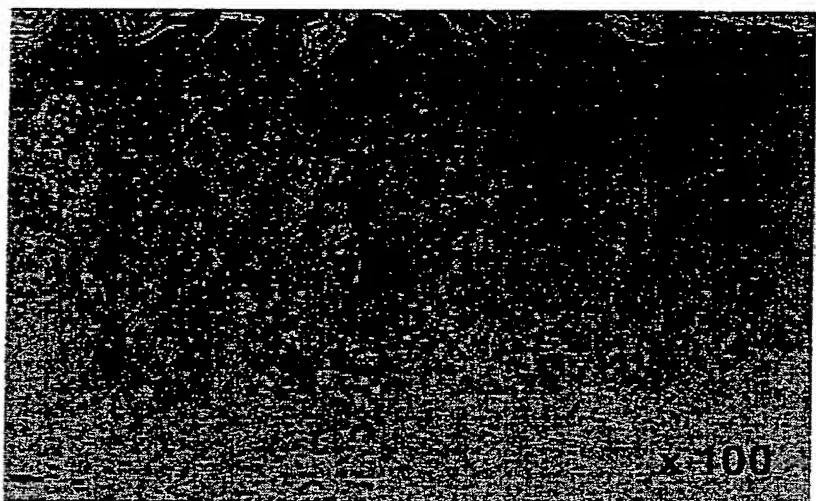
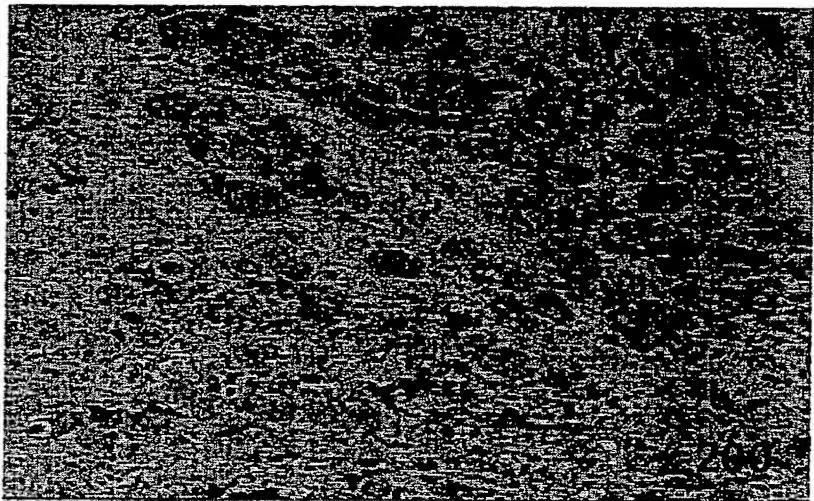


図 2

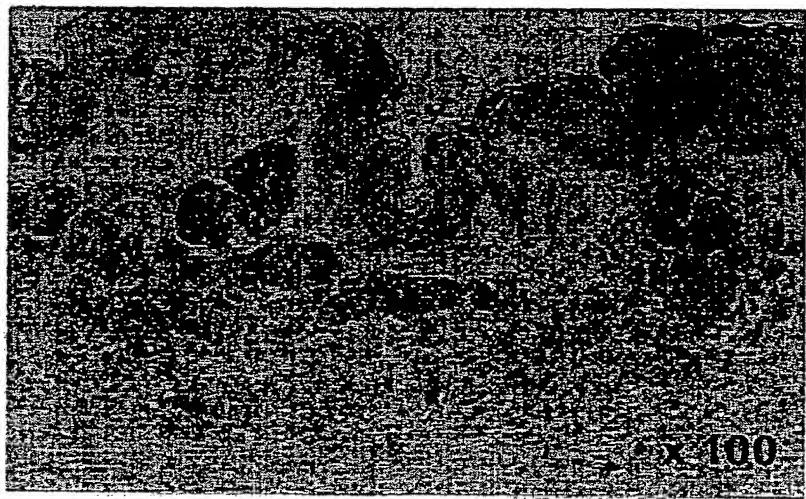
A



B



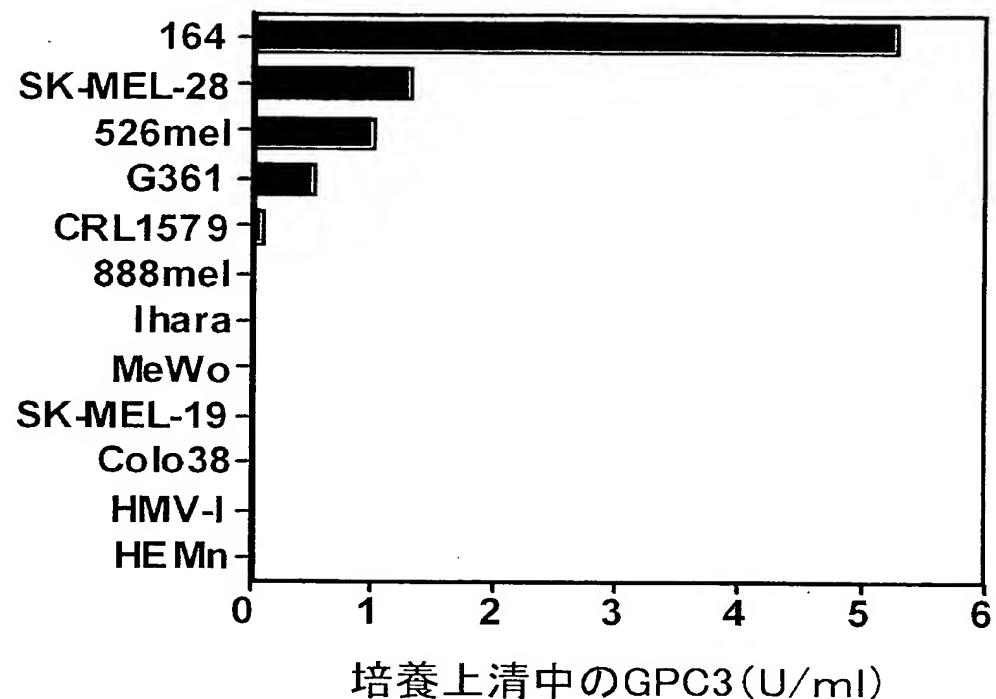
C



BEST AVAILABLE COPY

図 3

A



B

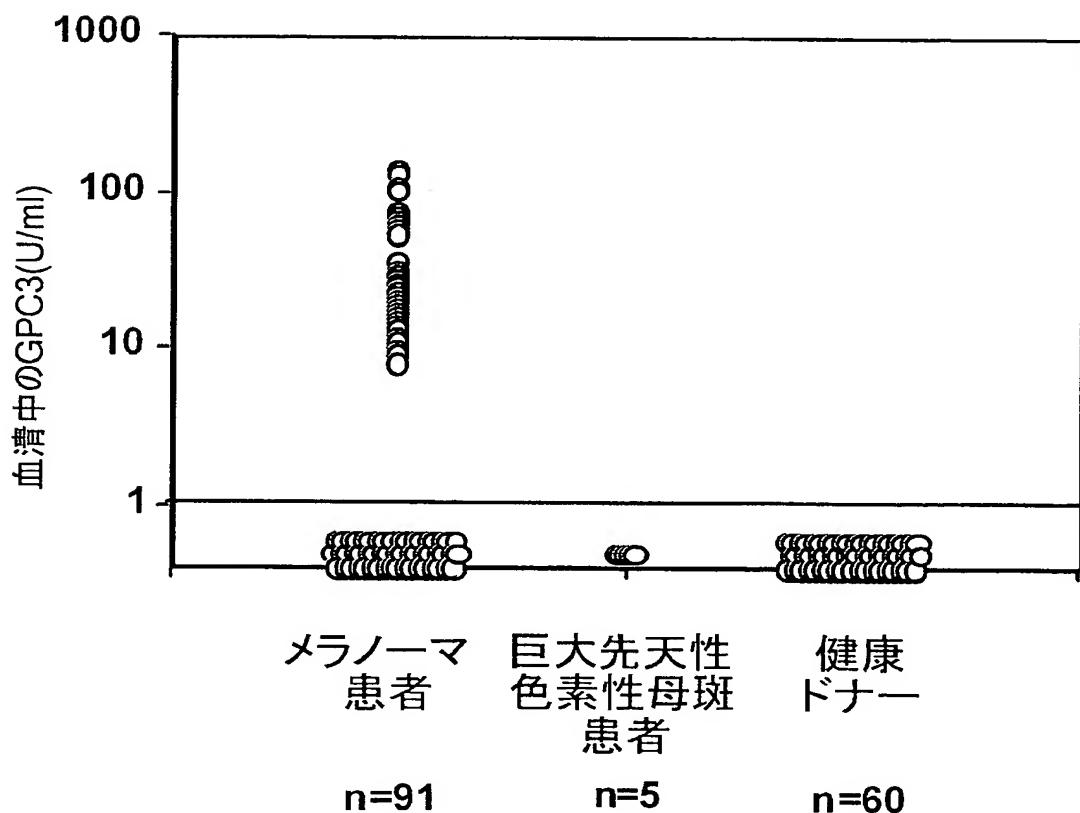
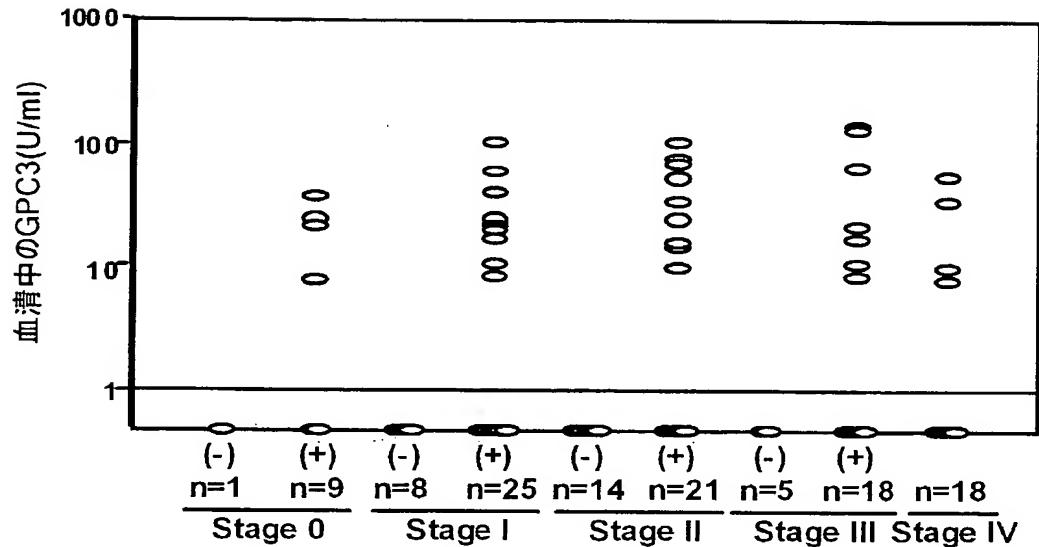
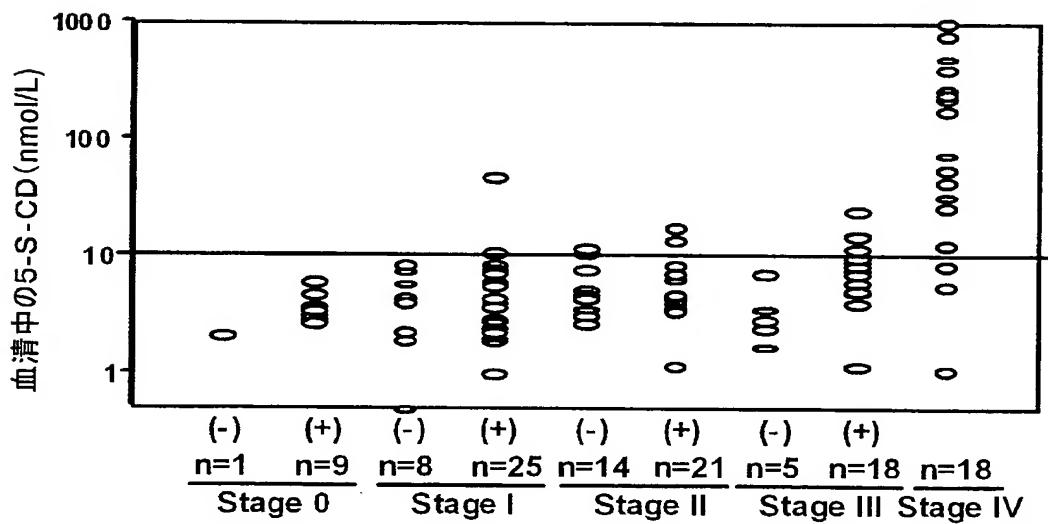


図 4

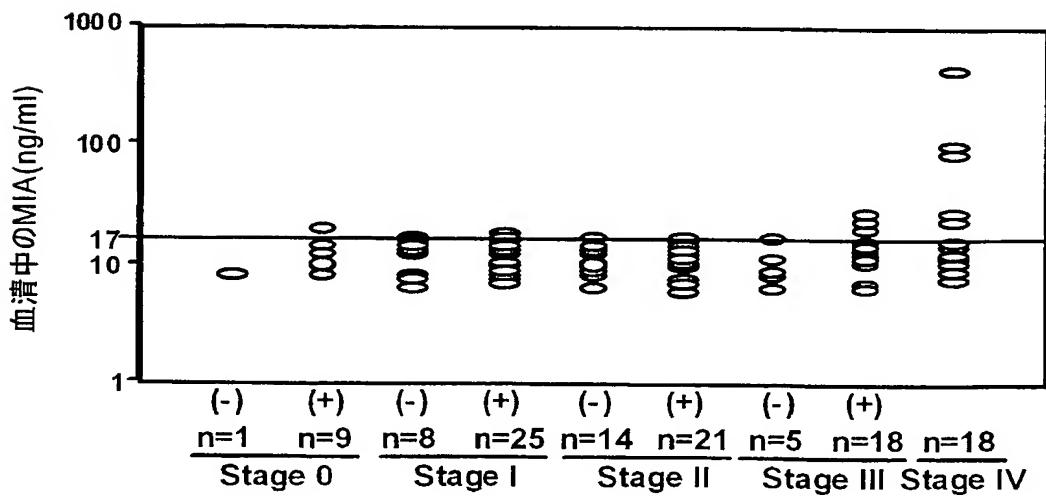
A



B



C



SEQUENCE LISTING

<110> Kumamoto Technology and Industry Foundation

<120> A diagnostic agent for malignant melanoma

<130> A41803A

<160> 6

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 1

acgggatggt gaaagtgaag a 21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 2

gaaagagaaa agagggaaac a 21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 3  
gttactgcaa tgtggtcatg c 21  
<210> 4  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer  
<400> 4  
ctggtgccca gcacatgt 18  
<210> 5  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer  
<400> 5  
cctcgccctt gccgatcc 18  
<210> 6  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer  
<400> 6  
ggatcttcat gaggttgtca gtc 23